

Immunogenność rekombinowanych komórek klonu AG przeciwko zakażeniu wirusem BLV

JAN RUŁKA, EWA BUZAŁA

Pracownia Patologii Komórkowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Rułka J., Buzała E.

Immunogenicity of AG cell recombined clone against BLV

Summary

Determining the immunogenicity of AG cell recombined clone with DNA of the *env* gene of BLV for immunized ovine was the aim of our investigations. Positive results of ELISA (200-800) of the first ovine group vaccinated intramuscularly with 5×10^7 of AG cell was obtained at 4 weeks after the second immunization. The highest titers of antibodies were noted at 4 weeks after the third immunization (> 3200), after which it steadily decreased. At 5 months after immunization the value of antibodies was 100-800.

In the second group vaccinated with NCR cell producing full particles of BLV inactivated with β -propiolacton, the titer of antibodies at 4 weeks after the second and third immunizations were 200-800 and 800-3200 respectively. In the control group serological examination was negative. The most important results were obtained at 5 months after the third immunization in the biological test (challenge). Ovine immunized with AG cell were resistant to BLV virus infection, but in the second group only one in four vaccinated animals was found infected with BLV. Biological test of the control group was positive. As a result, the AG recombined cells with DNA of *env* BLV gene clearly stimulated the immunological system of the ovine to produce specific anti-BLV antibodies and made them resistant to infection with bovine leukosis virus.

Keywords: sheep, immunogenicity, recombination, BLV.

Wirus BLV (Bovine Leukemia Virus) jest egzogenym retrowirusem typu C wywołującym jedną z najbardziej rozpowszechnionych zakaźnych chorób limfoproliferacyjnych u bydła – białaczkę enzootyczną. Obok zakaźności wirusa dla bydła (4, 22, 25, 26), istnieje również możliwość doświadczalnego zakażenia nim innych gatunków zwierząt – królików, myszy, małp (10, 16, 26). Szczególną wrażliwość wykazują owce i kozy (3, 8, 15, 24). W Polsce enzootyczna białaczka jest nadal dużym problemem epizootycznym w hodowli bydła. Uwzględniając region kraju i wielkość stad bydła wykazano różny stopień ich zakażenia (5, 11, 13, 14).

Mimo efektywności diagnostyki serologicznej i skuteczności akcji zwalczania enzootycznej białaczki bydła, problem jej całkowitej likwidacji jest nadal otwarty. Jedną z metod pozwalającą na rozwiązanie tego problemu jest zastosowanie skutecznych, nowej generacji szczepionek. Przełomowym momentem w tej dziedzinie stały się osiągnięcia biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Szczególnie istotnym było zastosowanie technik rekombinacji materiału genetycznego wirusa BLV, ekspresja w pełni immunogennych białek wirusowych i pozbawienie go cech zakaźności (1, 2, 9, 17, 19-21, 23). Zakażone bądź immunizowa-

ne zwierzęta produkują swoiste przeciwciała odpornościowe anti-BLV, skierowane przeciwko otoczkowej glikoproteinie gp51 i gp30 oraz białku rdzenia wirusa – proteinie p24. W większości przypadków są to przeciwciała skierowane przeciwko glikozyłowanej części gp51 odpowiedzialnej za podstawowe właściwości biologiczne wirusa BLV – zakaźność, stymulację przeciwciał neutralizujących i cytolitycznych oraz właściwości hemaglutynacyjne czy też wywoływanie efektu syncytialnego.

Celem podjętych badań była wstępna ocena odpowiedzi immunologicznej u owiec szczepionych rekombinowanymi komórkami klonu AG, syntezującymi otoczkową glikoproteinę gp51 wirusa BLV. Istotnym elementem badań było porównanie tej odpowiedzi z wynikami immunizacji owiec komórkami NCR, kodującymi strukturalne białka wirusa białaczki enzootycznej.

Materiał i metody

Hodowla komórek AG. Antygen stanowiły rekombinowane komórki klonu AG, zawierające w swoim genomie DNA genu *env* wirusa BLV, syntezujące otoczkową glikoproteinę gp51 i transmembranową glikoproteinę gp30. Selekcję klonalną komórek prowadzono w temp. 37°C i

atmosferze CO₂ w płynie wzrostowym Eagle'a z dodatkiem 6% inaktywowanej surowicy cielęcej nie zawierającej swoistych przeciwciał anti-BLV. Celem uzyskania odpowiedniej puli antygeny, komórki klonu AG namnażano w postaci jednowarstwowej hodowli na płytkach Petry'ego, zlewano z nich supernatant, przemywano 2 ml zimnego NaCl 0,9% i zdrapywano szklaną bagietką, po czym przenoszono do 50 ml probówki wirówkowej umieszczonej w lodzie. Uzyskaną zawiesinę komórek wirowano 10 min. 2500 obr./min., a następnie przygotowano żadaną ich koncentrację i zawieszano w nośniku z adiuwantem arlacelowym. Do immunizacji owiec użyto 5×10^7 żywych komórek przechowywanych zwykle dwa dni w temp. 4°C w nośniku stanowiącym 0,9% NaCl, z dodatkiem 2% świeżej inaktywowanej surowicy końskiej.

Komórki NCR (New Cell Recombinated). Do badań referencyjnych zamiast komórek FLK/BLV, użyto komórek własnej linii (wariant polski) produkujących pełnostrukturalne cząstki wirusa BLV. Komórki NCR, uzyskane drogą kokulturywacji komórek nerki płodu owcy limfocytami krwi krowy białaczkowej, przygotowywano w identyczny sposób jak i komórki klonu AG z tą różnicą, że płyn wzrostowy stanowił płyn RPMI z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej. Do immunizacji zwierząt przygotowywano każdorazowo, podobnie jak i w przypadku komórek klonu AG, świeżą ich zawiesinę. Tuż przed immunizacją owiec przeprowadzano inaktywację wirusa BLV w komórkach NCR przy pomocy β -propiolaktonu (0,5 μ l/ml antygeny przez 5 godzin w temp. 20-23°C). Następnie do obu zawiesin komórek dodawano 20% arlacelu A i homogenizowano przy pomocy zwykłej strzykawki a 20 ml z cienką igłą \varnothing 0,5 mm. Stosowana dawka komórek była analogiczna, jak i w przypadku komórek klonu AG.

Zwierzęta. Do badań użyto 10 owiec rasy kent w wieku 6-8 miesięcy, wagi około 25 kg. Zwierzęta podzielono na trzy grupy, wśród których pierwszą stanowiły 4 owce szczepione komórkami klonu AG, drugą grupę – 4 owce szczepione komórkami NCR i grupa trzecia – 2 owce kontrolne nieszczepione. Badane zwierzęta immunizowano trzykrotnie drogą domięśniową w odstępach 4 tygodni. Antygen stanowiły komórki AG lub NCR zawieszane w 1 ml nośnika z dodatkiem równej objętości arlacelu A jako adiuwantu. Próbkę krwi do badań serologicznych testem ELISA pobierano przed szczepieniem (badanie „0”), 4 tygodnie po I i II immunizacji, 0,5, 1, 2, 3, 4 i 5 miesięcy po III szczepieniu oraz 4 tygodnie po zakażeniu zwierząt strukturalnym wirusem białaczki – próba biologiczna (challenge).

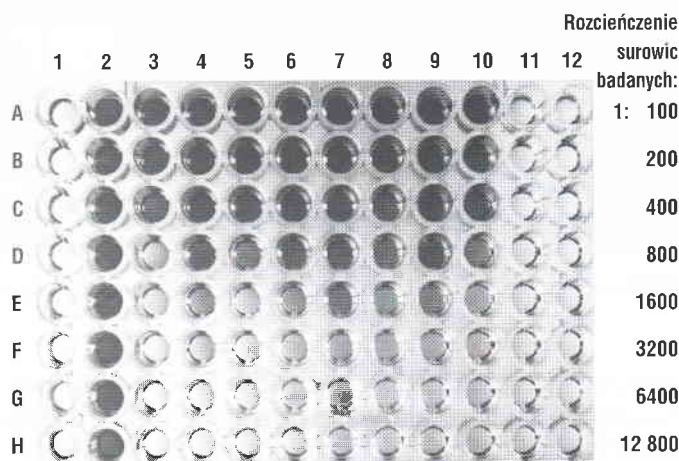
Badanie serologiczne. Kontrolę przeciwciał odpornościowych anti-BLV prowadzono testem ELISA produkcji Bioveta Ivanowice – CR. Przeciwciała określano przez okres 5 miesięcy po III immunizacji oraz 4 tygodnie po challenge'u. Odczyt wyników wykonywano na spektrofotometrze Dynatech MR 5000, przy długości fali 490 nm. Dodatkowo miano surowicy badanej stanowiło najwyższe jej rozcieńczenie, w którym liczba absorpcji próbki wynosiła $> 0,100$.

Próba biologiczna (challenge). Badanie to przeprowadzono w 5 miesięcy po III immunizacji zwierząt. Do zakażenia owiec użyto około 10^3 limfocytów krwi krowy białaczkowej. Obecność zakaźnego wirusa BLV w limfocytach krwi badanych owiec określano testem syncytialnym.

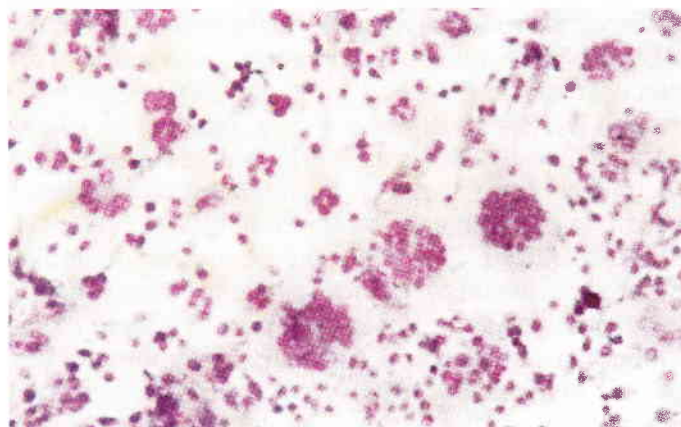
Test syncytialny. Przeprowadzono go na 24-dółkowych płytkach NUNCLON używając około 5×10^5 limfocytów krwi badanych owiec oraz jako komórek detektorowych 24 godzinnej jednowarstwowej hodowli komórek CC81. Ostateczny wynik testu odczytywano po 5 dniach inkubacji w temp. 37°C i atmosferze 5% CO₂ oraz po ich wybarwieniu odczynnikami Giemzy. Dodatkim rezultatem było pojawienie się wielojądrowych komórek – syncytium przybierającym wygląd pierścienia lub nieregularnej tarczy. Utworzone syncytia zawierały z reguły od 15 do 120 jąder komórkowych.

Wyniki i omówienie

Uzyskane rezultaty przedstawia tab. 1 oraz ryc. 1 i 2. Przeprowadzone badania wykazały obecność swoistych przeciwciał odpornościowych anti-BLV w surowicy krwi szczepionych owiec. Zwierzęta immunizowane drogą domięśniową dawką 5×10^7 rekombinowanych komórek klonu AG, już w 4 tygodnie po drugiej immunizacji, wykazywały dodatnie miana prze-



Ryc. 1. Wyniki testu ELISA surowic owiec immunizowanych rekombinowanymi komórkami klonu AG i komórkami NCR, w 4 tygodnie po III szczepieniu: 1A-1D blank, 1E-1H referencyjna surowica ujemna, 2A-2H referencyjna surowica anti-BLV, 3A-6A surowice owiec immunizowanych komórkami AG, A7-A10 surowice owiec immunizowanych komórkami NCR, A11/12 surowice owiec kontrolnych (nie szczepionych)



Ryc. 2. Dodatni wynik testu syncytialnego. Utworzone syncytium zawierało około 15-120 jąder komórkowych (pow. 120 \times)

Tab. 1. Wyniki immunizacji owiec antygenem zawierającym rekombinowane komórki AG i komórki NCR

Grupa	Liczba owiec	Antygen			Miano przeciwciał anti-BLV w surowicy krwi owiec (ELISA)										Challenge ELISA (test syncytialny)	
		rodzaj komórek	ilość	droga podania	4 tyg. po immun.			miesiące po III immun.								
					„0”	I	II	0,5	1	2	3	4	5			
I	4	klon AG	5×10 ⁷	i.m.	-	50 ^N	200	400	400	400	400	400	200	100	50	-
					-	100	400	3200	<3200	3200	3200	1600	800	800	-	
					-	50	200	800	800	400	400	400	200	200	-	
					-	100	800	1600	1600	800	800	800	400	400	-	
					GMT	70	336	1130	1130	800	713	283	226	226		
II	4	komórki NCR	5×10 ⁷	i.m.	-	100	800	3200	3200	1600	1600	800	800	800	+	
					-	50	200	800	800	400	400	400	200	800	+	
					-	400	800	1600	800	800	400	400	200	800	-	
					-	100	200	800	800	800	400	200	200	400	+	
					GMT	119	283	2180	951	800	565	283	238	673		
III	2	kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	+		
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	+		

Objaśnienie: N – najwyższe rozcieńczenie surowicy badanej z dodatnim wynikiem testu ELISA.

ciwciał w teście ELISA – od 1:200 do 1:800. W późniejszym okresie notowano równie wysokie miana przeciwciał, przy czym w 4 miesiącu notowano niewielki ich spadek. Najwyższą ich wartość liczbową stwierdzono w 4 tygodnie po III immunizacji – 1: > 3200 (ryc. 1). Potwierdzeniem wysokich mian przeciwciał odpornościowych była ich średnia geometryczna – GMT (Geometric Mean Titer). W 4 tygodnie po I i II immunizacji oraz w 0,5, 1, 2, 3, 4 i 5 miesięcy po III immunizacji wartości te wynosiły kolejno: 70, 336, 1130, 1130, 800, 713, 283 i 226.

W grupie drugiej immunizowanej komórkami NCR stwierdzono również wysokie miana przeciwciał anti-BLV. W 4 tygodnie po II immunizacji dodatnie miana przeciwciał wahały się od 1:200 do 1:800, zaś najwyższe ich wartości notowano w dwa tygodnie po III immunizacji (od 1:800 do 1:3200). Średnie wartości geometryczne przeciwciał, w wymienionych terminach badań, wynosiły tu odpowiednio: 119, 283, 2180, 951, 800, 565, 283 i 238. W grupie kontrolnej dodatnich mian przeciwciał w teście ELISA nie notowano. Z zadowoleniem należy podkreślić, że w grupie owiec immunizowanych rekombinowanymi komórkami klonu AG notowano równie wysoką odpowiedź immunologiczną, jak i w grupie owiec immunizowanych komórkami produkującymi pełnostrukturalny wirus białaczki bydła. Uzyskane rezultaty kontroli odpowie-

dzi immunologicznej owiec grupy pierwszej napawają optymizmem. W efekcie uzyskano wyraźną stymulację układu immunologicznego owiec białkiem kodowanym przez niezakaźny rekombinant DNA zawierający w swojej strukturze gen *env* wirusa białaczki bydła. Wytworzone przeciwciała utrzymywały się na wysokim poziomie przez okres co najmniej 5 miesięcy po immunizacji zwierząt.

Niewrażliwość immunizowanych owiec na zakażenie strukturalnym wirusem BLV sprawdzano próbą biologiczną. Uzyskane rezultaty przedstawia tab. 1 i ryc. 2. Jak wykazano wszystkie zwierzęta grupy pierwszej szczepionej DNA rekombinantu genu *env*/BLV wykazywały ujemny wynik reizolacji wirusa białaczki z limfocytów krwi szczepionych owiec (test syncytialny). Podobne wyniki immunizacji zwierząt uzyskali inni autorzy (1, 7, 12, 18, 19, 21, 23). Altaner i wsp. (1) uodporniając bydło heterologicznymi komórkami NP-2 transfekowanymi DNA genu *env*/BLV, wykazali długotrwałą obecność przeciwciał neutralizujących w surowicy krwi szczepionych zwierząt oraz ich niewrażliwość na zakażenie strukturalnym wirusem BLV.

Najistotniejszą zaletą szczepionek rekombinowanych jest możliwość replikacji użytego materiału DNA w organizmie zwierząt i stymulacja silnego efektu immunogenego. Ohishi i wsp. (18) stosując komórki nerki królika transfekowane rekombinantem wirusa

vaccinii (rVV) uzyskali zarówno dobrą ekspresję otoczkowej glikoproteiny gp51 wirusa w lizatach komórkowych, jak i dobrą stymulację swoistych przeciwciał odpornościowych w organizmie szczepionych zwierząt. W kolejnych badaniach Ohishi i wsp. (20) wykazali, że rekombinant rVV (mO-HA/ATI), kodujący białko gp51 stymuluje nie tylko dobrą odporność na zakażenie pełnym wirusem BLV, ale i co ciekawsze obniża jego replikację w organizmie zakażonych zwierząt. Podobne rezultaty ci autorzy uzyskali stosując rekombinowane komórki RK-13 (19). Badania te wykazały, że glikoproteina gp60 wirusa BLV, odpowiedzialna za indukcję przeciwciał neutralizujących, eliminuje *in vitro* tworzenie się syncytium w komórkach zakażonych. Portetelle i wsp. (23) z kolei donoszą, że króliki immunizowane śródskórnym oczyszczonym i natywnym białkiem gp51 i gp30, uzyskanym z rekombinantu wirusa vaccinii (vP459), wytwarzają wysokie miana przeciwciał neutralizujących, zaś w krótkoterminowej hodowli ich limfocytów krwi, nie wykazano wirusa zakaźnego. W efekcie krew królików pobrana w 3 miesiące od szczepienia nie była zakaźna dla owiec kontrolnych. Wysoką efektywność immunogenną rekombinanta DNA wirusa vaccinii-BLV, upatrują autorzy w jego stabilnej strukturze materiału genetycznego oraz obecności na ich powierzchni takich oligomerów, jakie obserwuje się na powierzchni pełnych cząstek wirusa białaczki. Ciekawe badania przeprowadzili Kumar i wsp. (12). Autorzy stosując trzy różne warianty rekombinantowe DNA wirusa vaccinii i genu *env*/BLV, wykazali różny stopień odpowiedzi immunologicznej u królików po śródskórnym szczepieniu komórkami CV-1. Komórki te transfekowane DNA pierwszego rekombinantu VV-BLV1, kodującego kompletną sekwencję 301 aminokwasów glikoproteiny gp51 i 133 z 214 aminokwasów glikoproteiny gp30, nie indukowały w organizmie królików swoistych przeciwciał anty-BLV przez okres 10 tygodni. Użycie pełnej sekwencji DNA genu *env* (gp51 i gp30) pod kontrolą promotora VVp7,5 (wariant VV-BLV2) podniosło ekspresję swoistych białek wirusowych i u jednego z trzech królików immunizowanych, już w dwa tygodnie po szczepieniu, notowano dodatnie miana przeciwciał odpornościowych. Wprowadzenie z kolei silniejszego promotora PFE/L do rekombinantu VV-BLV3, przy pełnej sekwencji DNA genu *env*, pozwoliło uzyskać najlepszą ekspresję białek wirusowych i pełną ich immunogenność. W efekcie wszystkie króliki szczepione wytwarzały w 5 tygodni po szczepieniu wysokie miana przeciwciał (odczyn ID i immunoprecypitacji). Przeprowadzone badania podkreślają istotną i wysoce komplementarną rolę białka gp30 w stymulacji pełnej odpowiedzi immunologicznej u szczepionych zwierząt.

Niespodziewane wyniki uzyskano w grupie drugiej immunizowanej komórkami NCR syntetyzującymi pełne cząstki wirusa BLV. Spośród 4 owiec szczepionych drogą domięśniową, tylko u jednej z nich wynik testu

syncytialnego był ujemny, zaś u pozostałych – podobnie jak w grupie zwierząt kontrolnych, reizolowano zakaźny wirus białaczki. Utworzone syncytia wykazywały z reguły w swojej strukturze od 15 do 120 jąder komórkowych (ryc. 2). Uzyskane rezultaty wskazują najprawdopodobniej na brak pełnej inaktywacji cząstek wirusa białaczki bydła w komórkach NCR oraz na drugorzędą rolę przeciwciał odpornościowych anty-BLV w procesie zakażenia. Badania te pośrednio wskazują również na inny – komórkowy mechanizm ochrony zwierząt. Przypuszczenia te potwierdzają badania innych autorów, którzy wykazali, że obecność komórek CD4 i CD8 warunkuje odporność zwierząt na zakażenie ich strukturalnym wirusem enzoptycznej białaczki bydła (2, 6, 7, 21).

Reasumując wyniki przeprowadzonych badań należy przyjąć, że immunizacja owiec drogą domięśniową rekombinowanymi komórkami klonu AG, zawierającymi materiał DNA wirusa białaczki bydła, dała dobre rezultaty. Uzyskany poziom przeciwciał swoistych anty-BLV był równie wysoki jak i po szczepieniu referencyjnymi komórkami NCR. Najistotniejszym osiągnięciem przeprowadzonych badań jest nie tylko indukcja wysokiego poziomu przeciwciał odpornościowych u owiec grupy pierwszej, ich niewrażliwość na zakażenie pełnym wirusem BLV, ale przede wszystkim wykazanie podstawowej cechy szczepionek genetycznych jakim jest brak zakaźności rekombinowanego DNA wirusa białaczki dla organizmu szczepionych zwierząt.

Piśmiennictwo

- Altaner C., Altanertova V., Ban J., Janik V., Volejnecik V., Frajs Z., Cerny L.: J. Vet. Med. B. 35, 736, 1988.
- Altaner C., Ban J., Altanertova V., Janik V.: Vaccine 9, 889, 1991.
- Avram N., Pannescu G., Gungeanu A., Gradinaru D., Begnescu R., Moldawan G.: Arch. Vet. 13, 89, 1978.
- Ferrer J., Abt D., Bhatt D., Marshak R.: Cancer Res. 34, 893, 1974.
- Ganowicz M.: Mat. III Kongresu PTNW, Warszawa 2, 172, 1987.
- Gatei M., Good M., Daniel R., Lavin M.: J. Virol. 67, 1796, 1993.
- Gatei M., Naif H., Kumar S., Boyle D., Daniel R., Good M., Lavin K.: J. Virol. 67, 1803, 1993.
- Grundboeck-Juško J., Reichert M.: Medycyna Wet. 46, 284, 1990.
- Hertig C., Pye A., Hyatt A., Boyle D.: J. Gen. Virol. 75, 2213, 1994.
- Irvin A., Brown C., Kanthai G., Stago D.: Res. Vet. Sci. 22, 53, 1977.
- Kolacz J.: Życie wet. 67, 97, 1992.
- Kumar S., Andrew M., Boyle D., Branton R., Lavin M., Daniel R.: J. Virol. 17, 131, 1990.
- Losieczka K., Klimentowski S.: Medycyna Wet. 44, 270, 1988.
- Losieczka K., Klimentowski S.: Medycyna Wet. 44, 328, 1988.
- Mammreich M., Burny A., Portetelle D.: Vet. Microbiol. 1, 347, 1976.
- Mammreich M., Portetelle D., Burny A.: Zbl. Vet. Med. B. 21, 69, 1981.
- Merza M., Söber J., Sundquist B., Toots I., Morein B.: Arch. Virol. 120, 219, 1991.
- Ohishi K., Maruyama T., Shida H., Nishimahi J. et. al.: Vaccine 7, 428, 1988.
- Ohishi K. i wsp.: Am. J. Vet. Res. 51, 1170, 1990.
- Ohishi K. i wsp.: J. Gen. Virol. 72, 1887, 1991.
- Okada K. i wsp.: Vet. Pathol. 30, 104, 1993.
- Onuma M. i wsp.: Am. J. Vet. Res. 45, 1213, 1984.
- Portetelle D. i wsp.: Vaccine 9, 194, 1991.
- Ressang A.: Vet. Microbiol. 1, 359, 1976.
- Stock N., Ferrer J.: J. Natl. Cancer Inst. 48, 985, 1972.
- Van Der Maaten, Müller J.: Vet. Microbiol. 1, 351, 1976.